

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische
Biochemie der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Isolierung und Charakterisierung des spezifischen
Trypsininhibitors aus Schafpankreas
(Primärstruktur, Pharmakokinetik und Verhalten gegen-
über proteolytischen Enzymen)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Wolfgang Schramm
aus
Oettingen / Bayern

München 1971

1970



Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 1970

Isolierung des Trypsininhibitors aus Schafspankreas, Verhalten gegenüber proteolytischen Enzymen

HANS FRITZ*, WOLFGANG SCHRAMM**, BRIGITTE GREIF, KARL HOCHSTRASSER, EDWIN FINK und
EUGEN WERLE

Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München

(Der Schriftleitung zugegangen am 18. November 1969)

Zusammenfassung: Der Trypsininhibitor aus Schafspankreas wurde über wasserunlösliches Trypsinharz angereichert und durch Gelfiltration und Ionenaustausch-Chromatographie weiter gereinigt. Gegenüber dem Inhibitor (KAZAL-Typ) aus Rinderpankreas^{4, 7, 9, 13} ist beim Inhibitor aus Schafspankreas ein Serinrest ersetzt durch einen Alaninrest. Dieser Befund wurde durch die Analyse der

tryptischen Peptide des Schafspankreas-Inhibitors bestätigt²¹.

Der Trypsininhibitor aus Schafspankreas hemmt Chymotrypsin, Plasmin, Kallikreine und Thrombin (Esterolyse) nicht; er wird durch Trypsin (temporäres Hemmverhalten) und Chymotrypsin abgebaut.

Summary: Isolation of the trypsin inhibitor from sheep pancreas and its behaviour towards the proteolytic enzymes. The trypsin inhibitor from sheep pancreas was enriched by the use of a water-insoluble trypsin resin and further purified by gel filtration and ion exchange chromatography. Compared with the inhibitor (KAZAL type) from bovine pancreas^{4, 7, 9, 13}, a serine residue is replaced by an

alanine residue in the inhibitor from sheep pancreas. This finding was confirmed by the analysis of the tryptic peptides from sheep pancreas inhibitor²¹. The trypsin inhibitor from sheep pancreas does not inhibit chymotrypsin, plasmin, kallikreins or thrombin (esterolysis); it is degraded by trypsin (temporary inhibitor effect) and chymotrypsin.

Bauchspeicheldrüsen verschiedener Tiere und des Menschen enthalten spezifische Trypsininhibitoren^{1–11}, die mit den Proenzymen in den Pankreas-

saft sezerniert werden^{1–3, 5, 6–9}. Der 1948 von KAZAL¹² aus Extrakten von Rinderpankreasgewebe isolierte Trypsininhibitor ist nach den Untersuchun-

* Anschrift: Priv.-Doz. Dr. H. FRITZ, D-8 München 15, Nußbaumstraße 20.

** Der Arbeit liegt die Dissertation von WOLFGANG SCHRAMM zugrunde.

Enzyme:

Chymotrypsin (EC 3.4.4.5)

Kallikrein (EC 3.4.4.21)

Plasmin (EC 3.4.4.14)

Thrombin (EC 3.4.4.13)

Trypsin (EC 3.4.4.4)

Abkürzung: BAEE = *N*¹-Benzoyl-L-arginin-äthylester.

¹ H. FRITZ, H. HARTWICH u. E. WERLE, diese Z. **345**, 150 [1966].

² H. FRITZ, F. WOITINAS u. E. WERLE, diese Z. **345**, 168 [1966].

³ H. FRITZ, I. HÜLLER, M. WIEDEMANN u. E. WERLE, diese Z. **348**, 405 [1967].

⁴ H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD, H. HAENDLE u. E. WERLE, Ann. New York Acad. Sci. **146**, 400 [1968].

⁵ E. WERLE, I. TRAUTSCHOLD, H. HAENDLE u. H. FRITZ, Ann. New York Acad. Sci. **146**, 464 [1968].

⁶ H. FRITZ, M. HUTZEL, I. HÜLLER, M. WIEDEMANN, H. STAHLHEBER, P. LEHNERT u. M.-M. FORELL, diese Z. **348**, 1575 [1967].

⁷ L. J. GREENE, M. RIGBI u. D. S. FACKRE, J. biol. Chemistry **241**, 5610 [1966].

⁸ L. J. GREENE, J. J. DICARLO, A. J. SUSSMAN u. D. C. BARTELT, J. biol. Chemistry **243**, 1804 [1968].

⁹ L. J. GREENE, Ann. New York Acad. Sci. **146**, 386 [1968].

gen von GREENE und Mitarb.^{7,9} identisch mit dem im Pankreassaft des Rindes vorkommenden Trypsininhibitor. Der von uns^{2,4,13} über wasserunlösliches Trypsinharz isolierte spezifische Trypsininhibitor aus Rinderpankreas ist mit diesen Präparaten ebenfalls identisch. Das Rinderpankreas enthält demnach nur 2 Proteaseinhibitoren, den „temporären“ Trypsininhibitor (KAZAL-Typ) und den polyvalenten Proteaseinhibitor (KUNITZ-WERLE-Typ, s. l. c.¹⁴), der Trypsin, Chymotrypsin, Kallikreine und Plasmin hemmt. Wir untersuchten nun die Bauchspeicheldrüsen von Schafen ebenfalls auf ihren Hemmstoffgehalt für Proteasen.

Material und Methodik

Trypsin, α -Chymotrypsin und Plasmin (Novo Industrie); Kallikrein aus Schweinepankreas¹⁵. Die Bestimmung der Aktivität und Hemmung der Enzyme erfolgte nach bekannten Methoden (Trypsin¹, Chymotrypsin², Plasmin³, Kallikrein³). 1 IU entspricht der Hemmung der Aktivität von ca. 1 mg Trypsin. — Bauchspeicheldrüsen von Schafen (Schlachthof-Material*); Kieselguradsorbat von Pankreasextrakten (Farbenfabriken Bayer**). Biogel P-2 (Bio-Rad Laboratories).

Ergebnisse

1. Isolierung

1. Gewinnung der Organextrakte

a) Aus Pankreasgewebe

Die Aufarbeitung erfolgte analog der Gewinnung des Inhibitors aus Hundepankreas¹ durch Fällung von Ballasteiweiß mit Perchlorsäure, Zerstörung des Tryp-

* Wir danken dem Münchener Schlachthof für die Überlassung der Drüsen.

** Den Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld, danken wir für die Herstellung des Kieselguradsorbates.

¹⁰ E. W. CERWINSKY, P. J. BURCK u. E. L. GRINNAN, *Biochemistry* [Washington] **6**, 3175 [1967]; P. J. BURCK, R. L. HAMILL, E. W. CERWINSKY u. E. L. GRINNAN, *Biochemistry* [Washington] **6**, 3180 [1967].

¹¹ H. TSCHESCHE, E. WACHTER, S. KUPFER u. K. NIEDERMEIER, *diese Z.* **350**, 1247 [1969].

¹² L. A. KAZAL, D. S. SPICER u. R. A. BRAHINSKY, *J. Amer. chem. Soc.* **70**, 3034 [1948].

¹³ H. FRITZ, K. HOCHSTRASSER, E. WERLE, B. BREY u. M. GEBHARDT, *Z. analyt. Chem.* **243**, 452 [1968].

¹⁴ R. VOGEL, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, *Natürliche Proteinase-Inhibitoren*, S. 57, Thieme-Verlag, Stuttgart 1968.

¹⁵ H. FRITZ, I. ECKERT u. E. WERLE, *diese Z.* **348**, 1120 [1967].

sinogens durch kurzes Erhitzen der sauren Extrakte auf 60–70°C und Neutralisation mit Kaliumcarbonat. Die inhibitorhaltigen Lösungen wurden zur Entfernung von Schwebstoffen durch eine 2–3 cm dicke Schicht aus Cellulosepulver filtriert und danach stark eingeeengt. Durch Dialyse (3 h bei 20°C) gegen dest. Wasser ließ sich die Hauptmenge der Salze ohne Inhibitorverlust entfernen.

Bis zu 1 h nach Tötung der Tiere entnommenes und aufgearbeitetes Pankreasgewebe enthielt ca. 85 IU/kg Gewebe, 6–8 h nach Beginn der Entnahme aufgearbeitetes Pankreasgewebe enthielt 38–56 IU/kg Gewebe. Die Bauchspeicheldrüsen wurden in eisgekühlten Gefäßen gesammelt.

b) Aus Kieselguradsorbat

Das Pankreasgewebe wurde wie bei der Isolierung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Trasyolol) aufgearbeitet. Ballasteiweiß durch Acetonzugabe gefällt und die löslichen Bestandteile an Kieselgur adsorbiert¹⁴. Das Kieselgurpulver (1 kg) wurde jeweils dreimal mit insgesamt 2 l dest. Wasser eluiert. Die vereinigten Lösungen wurden mit demselben Volumen 6proz. Perchlorsäure versetzt, der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und der trübe Überstand durch eine 2–3 cm dicke Schicht aus Cellulosepulver gesaugt. Das klare Filtrat wurde mit 5M K₂CO₃-Lösung neutralisiert.

Aus 1 kg Kieselgurpulver wurden so 850–900 IU für Trypsin erhalten; dies entspricht ca. 32 IU/kg Gewebe.

2. Anreicherung des Inhibitors über wasserunlösliches Trypsinharz

Die Bindung des Inhibitors an das wasserunlösliche Trypsinharz und die Dissoziation des Inhibitor-Trypsinharz-Komplexes erfolgte unter den von uns beschriebenen Bedingungen¹⁶ bei stetiger Kühlung (0–4°C). Von 250–500 IU in 0,7–1,7 l 0,2M Salz-Pufferlösung, pH 7,8, wurden vom Trypsinharz jeweils 75–90% gebunden. Vom wasserunlöslichen Komplex wurden in 0,2 bis 0,3M KCl/HCl-Lösung bei 2- bis 3maliger Elution 60 bis 75% der vom Trypsinharz gebundenen Inhibitormenge wieder eluiert.

Durch diesen Isolierungsschritt wurde eine etwa 100fache Anreicherung des Inhibitors, bezogen auf den Gehalt an Protein (Biuret), erzielt. Vgl. dazu l. c.¹⁶, Tab. 3, S. 135.

3. Fraktionierung durch Gelfiltration und über CM-Cellulose

Begleitsubstanzen mit höherem und niedrigerem Molekulargewicht wurden von dem über das Tryp-

¹⁶ H. FRITZ, M. GEBHARDT, E. FINK, W. SCHRAMM u. E. WERLE, *diese Z.* **350**, 129 [1969].

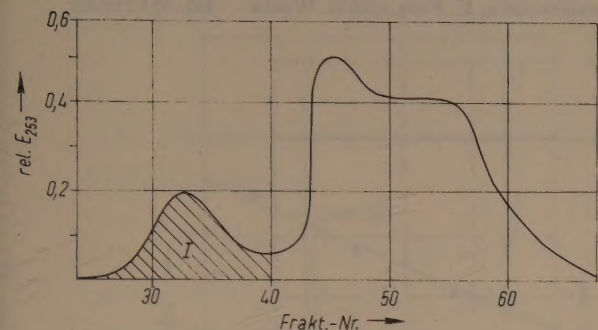


Abb. 1. Gelfiltration der über Trypsinharz angereicherten Inhibitorfraktionen.

Sephadex-G-50-Säule ($130 \times 1,6$ cm), äquilibriert mit 0,01M Äthylendiamin/Essigsäure, pH 7,5. Das Eluat wurde in 10-ml-Frakt. (10–15 Tropfen/min) gesammelt. Schraffierter Bereich: Fraktionen mit Inhibitoraktivität.

sinharz angereicherten Inhibitor (spezif. Aktiv.: 1–2 IU/mg Biuret-Protein) durch Fraktionierung an Sephadex-G-50-Säulen abgetrennt (Abb. 1). Von der jeweils auf die Säule aufgetragenen Hemmaktivität von 80–132 IU in 20–30 ml wurden 92–95 % im symmetrischen Inhibitorpeak (I in Abb. 1) wieder eluiert. Die inhibitorhaltige Fraktion wurde lyophilisiert. Das dabei anfallende flockige Pulver wurde in 0,01M Triäthanolaminpuffer, pH 6,5, gelöst und die Lösung (115–145 IU in ca. 3 ml) auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte CM-Cellulose-Säule ($30 \times 1,6$ cm) aufgetragen. Der bei der Elution mit dem Äquilibrierpuffer (5 Tropfen/min, 10 ml/Frakt.) erhaltene symmetrische Inhibitorpeak (Absorption bei 253 nm) enthielt jeweils eine Hemmaktivität, die um 8–10 % über der auf die Säule aufgetragenen lag.

4. Entsalzung

Die Entsalzung der inhibitorhaltigen Lösungen erfolgte über Bio-Gel-P-2-Säulen (PlexiglasmanTEL, $70 \times 3,2$ cm) mit 0,01M Essigsäurelösung als Elutionsmittel, wobei sich 86 % der aufgetragenen Inhibitormenge (408 IU in ca. 80 ml) in der salzfreien Inhibitorfraktion befanden.

Die Entsalzung wurde auch über Sephadex-G-50-Säulen mit 0,01M Essigsäurelösung sowie mit 0,02M Pyridinlösung als Elutionsmittel durchgeführt. Während sich letztere ebenfalls bewährte (Ausbeuten: 73–85 %), traten bei Verwendung der verd. Essigsäure beträchtliche Verluste (bis zu 50 %) an Inhibitoraktivität auf.

II. Eigenschaften und Bausteinanalyse

Die spezif. Aktivität der reinsten Präparate liegt bei 3,6 IU/mg Einwaage, d.h. 1 mg des Inhibitors hemmt die Aktivität von etwa 3,6 mg Trypsin. Bei der Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folien (0,05M Boratpuffer, pH 8,0) verhält sich das Präparat einheitlich. Die Bestimmung der Molekulargewichte durch Gelfiltration (Bedingungen s. l. c.¹⁷) ergab Werte von 6600 (pH 7,8) und 5800 (pH 3,5).

In der Tabelle sind die pro Mol Inhibitor gefundenen Mole Aminosäuren angegeben; die Interpretation erfolgt im Diskussionsteil. Mit Hilfe der Dansyl-Technik¹⁸ ließen sich Asp und Glu im etwa gleichen Mengenverhältnis als N-terminale Reste nachweisen.

Aus den Extinktionswerten der Absorptionskurve berechnet sich der Tryptophangehalt¹⁹ des Inhi-

Aminosäurezusammensetzung der Trypsininhibitoren aus Pankreas von Schaf und Rind (Angaben in Mol Aminosäure pro Mol Inhibitor).

	Schaf			Rind	
	20 h	70 h	GREENE ^a	ganz-zahlig	s. Text
Γ -O ₃ H					
Cys			6,13 ^b	6	
Asp	6,94	7,06	6,89	7	7
Thr	4,04	4,04	3,87	4	4
Ser	1,39	1,65	1,38	1	2
Glu	7,27	7,26	7,17	7	7
Pro	4,10	3,96	4,58	4	4
Gly	4,98	5,08	4,94	5	5
Ala	2,59	2,18	2,36	2	1
Cys	2,39	2,58	5,60	6	6
Val	3,74	3,79	3,99	4	4
Met	0,96	0,41	0,78	1	1
MetO ₂			1,01 ^b	1	
Ile	1,88	2,84	2,45	3	3
Leu	3,33	3,65	3,50	4	4
Tyr	1,85	1,60	1,82	2	2
Lys	3,11	3,10	3,17	3	3
Arg	2,77	2,95	2,86	3	3

a) Prof. Dr. L. J. GREENE, Brookhaven, USA, sind wir für die Durchführung der Analyse sehr dankbar.

b) Nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

¹⁷ H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, diese Z. **342**, 253 [1965].

¹⁸ W. R. GRAY, Methods in Enzymol. **11**, 139 [1967].

¹⁹ J. L. BAILY, Techniques in Protein Chemistry, 2. Aufl., S. 342, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1967.

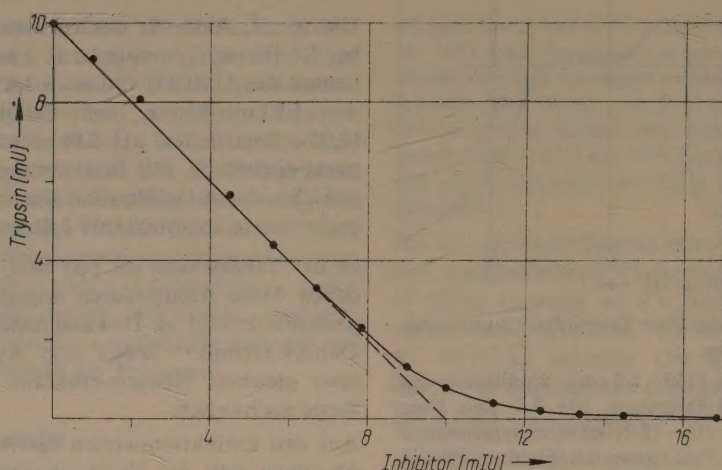


Abb. 2. Hemmkurve des Trypsininhibitors aus Schafspankreas.

Bedingungen wie I. c.³ (S. 411, Abb. 5): 1 mg *N*^α-Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid in 1 ml Wasser, 10 mU Trypsin, Inhibitorlösung (0,01–0,3 ml) und 0,2M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8, in 3 ml Endvolumen; Temp.: 25°C; Messung bei 405 nm.

bitors zu 0,2 Mol pro Mol Inhibitor (Spektralphotometer Leitz-Unicam SP 800, 1,3 mg Inhibitor in 2,0 ml 0,1N NaOH gelöst). Die Extinktion einer 0,1proz. Lösung des Inhibitors in dest. Wasser beträgt beim Extinktionsmaximum $E_{275,5} = 0,56$.

III. Verhalten gegenüber Enzymen

Zu den Untersuchungen wurden Inhibitorpräparate mit einer spezif. Aktiv. von 3,2–3,6 IU/mg Einwaage verwendet.

Trypsin

Die Hemmkurve (Abb. 2) des Trypsininhibitors aus Schafspankreas ist identisch mit der des spezifischen Trypsininhibitors (KAZAL-Typ, I. c.³, S. 411, Abb. 5, Kurve 2) aus Rinderpankreas, die unter denselben Bedingungen aufgenommen wurde. Die Komplexbildung erfolgt dabei sehr rasch: Der sofort (5–10 sec) nach Zugabe des Inhibitors zur Trypsinlösung (5 mIU Inhibitor plus 10 mU Trypsin in 2,0 ml 0,2M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8) meßbare Hemmgrad ändert sich mit zunehmender Inkubationszeit (bis zu 15 min) nicht; derselbe Hemmgrad wird auch gemessen, wenn der Inhibitor nach dem Substrat (1,0 mg *N*^α-Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitroanilid in 1,0 ml dest. Wasser) zur Trypsinlösung gegeben wird. Die Hemmung der Trypsinaktivität ist dabei zwischen pH 6,0 und 10,5 gleichbleibend optimal.

Die Dissoziationskonstante des Trypsin-Inhibitor-

Komplexes berechnet sich nach GREEN²⁰ aus der Hemmkurve (Abb. 2) zu $K_1 = 1 \cdot 10^{-9}$ M.

Das temporäre Hemmverhalten des Inhibitors aus Schafspankreas geht aus Abb. 3 hervor.

Chymotrypsin

15 min nach Zugabe von 60–150 mIU Inhibitor zu 1 mg Chymotrypsin in 2 ml 0,2M Triäthanolaminpuffer (plus 0,05M CaCl₂), pH 7,8, (inkubiert bei 40°C) war die Chymotrypsinaktivität nicht vermindert. Der Inhibitor wird jedoch durch Chymotrypsin abgebaut: Bei Inkubation von 1,5 mg Chymotrypsin mit 390 mIU Inhibitor in 6,0 ml 0,2M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8, bei 37°C waren nach 0,5 h noch 57 %, nach 2 h 19 % und nach 4 h nur noch 2 % der eingesetzten Inhibitoraktivität nachweisbar. Vgl. dazu I. c.³.

Plasmin, Kallikrein, Thrombin

Die BAEE-spaltende Aktivität von 0,2 Novo-Einheiten Plasmin wurde von 370 mIU des Inhibitors (inkubiert in 1,0 ml 0,05M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8) nicht beeinflusst. Die BAEE-spaltende Aktivität von Kallikrein wurde von dem Inhibitorpräparat (30 mIU Inhibitor plus 1 biologische Einheit Kallikrein in 1,0 ml 0,2M Puffer, pH 7,8) nur in sehr geringem Maße vermindert: Unter der Annahme, daß im Schafspankreas ähnlich wie im

²⁰ N. M. GREEN u. E. WORK, Biochem. J. **54**, 347 [1953].

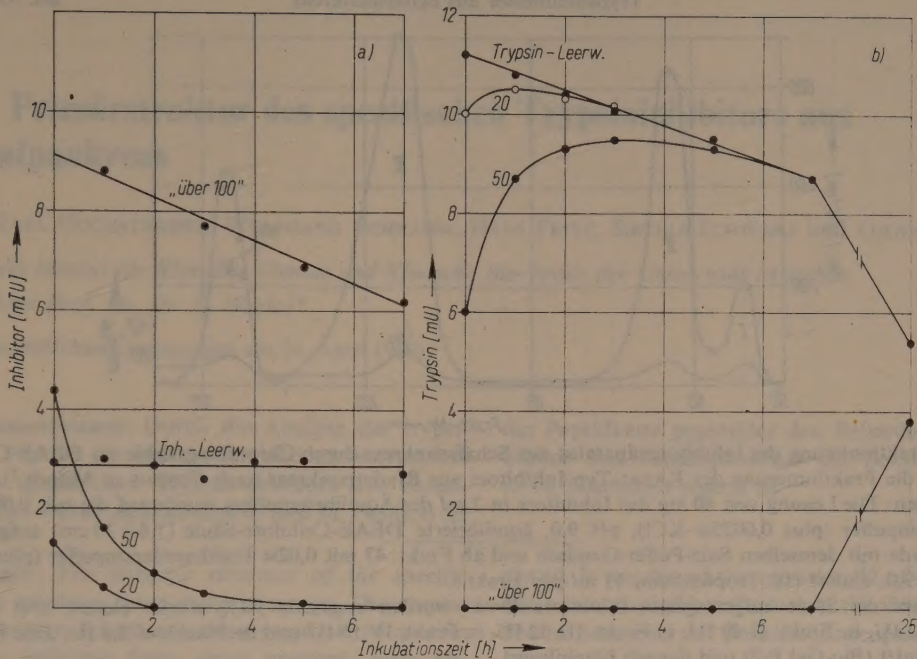


Abb. 3. Temporäre Hemmung: Abbau des Inhibitors aus Schafspankreas durch Trypsin.

a) Inhibitoraktivität in mIU nach Behandlung der Ansätze mit Perchlorsäure^{1,3}. Ansätze: Je 500 mU (0,5 mg) Trypsin plus Inhibitor für ca. 20proz., 50proz. und vollständige Hemmung; plus 0,05M Triäthanolaminpuffer (0,01M CaCl_2), pH 7,8, ad 5 ml. Inkubationstemp.: 37°C. 0,2 ml der Ansätze wurden mit 6proz. Perchlorsäure (1:1, v/v) enteiweißt, danach wurde die Inhibitorkonzentration (Ordinate) gemessen. Inh.-Leerw. = Inhibitorleerwert. b) Von je 0,1 ml der Ansätze für a) wurde gleichzeitig die Trypsinaktivität (Ordinate) bestimmt.

Rinderpankreas neben dem spezifischen Trypsin-Inhibitor noch ein polyvalenter Trypsin-Kallikrein-Inhibitor vorkommt, würde der Gehalt des Inhibitorpräparates an letzterem, berechnet aus der Kallikreinhemmung, bei 0,4 % liegen. Eine geringe, nicht stöchiometrische Hemmung der BAEE-spal tenden Aktivität von *Thrombin* durch größere Mengen des Inhibitors dürfte unspezifischer Natur sein.

Diskussion

Der Trypsininhibitor aus Schafspankreas unterscheidet sich vom KAZAL-Typ-Inhibitor aus Rinderpankreas, wie aus den Analysenwerten der Tabelle hervorgeht, nur durch den Austausch eines Serinrestes durch einen Alaninrest. Dieser Befund wurde inzwischen von HOCHSTRASSER und Mitarb.²¹ durch die Analyse der tryptischen Peptide des Schafspankreas-Inhibitors bestätigt. Danach sind die Aminosäurezusammensetzungen der trypti-

schen Peptide des Inhibitors aus Schafspankreas — bis auf die genannte Ausnahme — mit den von GREENE und Mitarb.²² für den KAZAL-Typ-Inhibitor aus Rinderpankreas angegebenen identisch. Die KAZAL-Typ-Inhibitoren beider Tierespecies dürften deshalb auch dieselbe Primärstruktur besitzen. Die Primärstruktur des Inhibitors aus Rinderpankreas wurde bereits aufgeklärt²³.

Die Bestimmung des *N*-Terminus mit Hilfe der Dansyl-Technik ergab in unseren Inhibitorpräparaten neben Asp (*N*-terminaler Rest des Rinderpankreas-Inhibitors^{22,23}) noch Glu. Da der Schafspankreas-Inhibitor während der Isolierung längere Zeit der Einwirkung von Trypsin (gebunden an den wasser-

²¹ K. HOCHSTRASSER, W. SCHRAMM, H. FRITZ, S. SCHWARZ u. E. WERLE, diese Z. **350**, 893 [1969].

²² L. J. GREENE u. J. S. GIORDANO JR., J. biol. Chemistry **244**, 285 [1969].

²³ L. J. GREENE u. D. C. BARTELT, J. biol. Chemistry **244**, 2646 [1969].

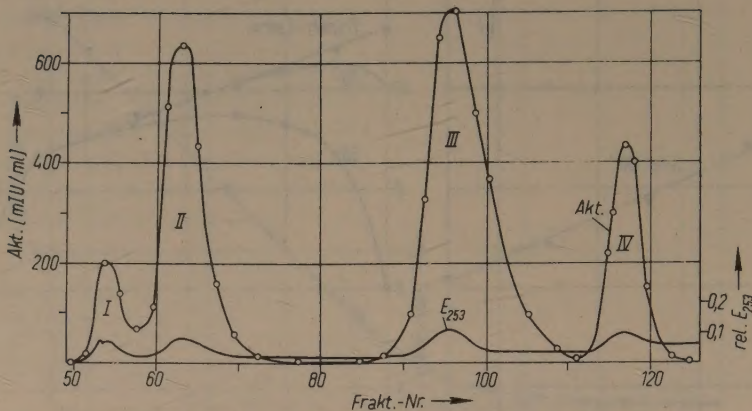


Abb. 4. Fraktionierung des Inhibitorpräparates aus Schafspankreas durch Chromatographie an DEAE-Cellulose (vgl. dazu die Fraktionierung des KAZAL-Typ-Inhibitors aus Rinderpankreas nach GREENE u. Mitarb.⁷).

Bedingungen: Die Lösung von 40 mg des Inhibitors in 3 ml des Äquilibriumspuffers wurde auf die mit 0,002M Tri-äthanolaminpuffer (plus 0,0025M KCl), pH 9,0, äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (1,6 × 30 cm) aufgetragen. Zuerst wurde mit demselben Salz-Puffer-Gemisch und ab Frakt. 47 mit 0,02M Triäthanolaminpuffer (plus 0,025M KCl), pH 9,0, eluiert (10 Tropfen/min, 11 ml pro Frakt.).

Von der auf die Säule aufgetragenen Inhibitoraktivität wurden insgesamt 90% wieder eluiert, und zwar in Frakt. I 6,2 IU, in Frakt. II 40 IU, in Frakt. III 52 IU, in Frakt. IV 15 IU und im Nachlauf 2,5 IU. Jede Fraktion wurde entsalzt (Bio-Gel P-2) und danach lyophilisiert.

Linke Ordinate: Inhibitoraktivität; rechte Ordinate: rel. Absorption bei 253 nm.

unlöslichen Harzträger) ausgesetzt war, ist eine teilweise Spaltung von Arg-Glu- oder Lys-Glu-Bindungen, die im KAZAL-Typ-Inhibitor vorkommen^{22,23}, denkbar. Beim Inhibitor aus Schweinepankreas wurden Spaltungen während der Isolierungsprozedur über Trypsinharze nachgewiesen²⁴. Aus den Ergebnissen der Analyse der tryptischen Peptide des Schafspankreas-Inhibitors²¹ geht hervor, daß bei einem Teil des vorliegenden Inhibitorpräparates das N-terminale Pentapeptid (Asn-Ile-Leu-Gly-Arg-, Sequenz nach l.c.^{22,23}) fehlt. Die Abspaltung des Pentapeptids durch Hydrolyse der Arg-Glu-Bindung könnte, wie erwähnt, während der Isolierung stattfinden. Es ist aber auch denkbar, daß im Schafspankreas, ähnlich wie im Schweinepankreas^{8,11}, zwei Inhibitoren mit unterschiedlicher Kettenlänge vorkommen. Auffallend ist in diesem Zusammenhang, daß bei der Aktivierung des Trypsinogens aus Schafspankreas zwei Peptide (Val-(Asp)₄-Lys und Phe-Pro-Val-(Asp)₄-Lys) erhalten werden. Das heißt, daß Trypsinogen, im Gegensatz zu dem aus Rinderpankreas, ebenfalls in zwei genetisch bedingten Varianten vorliegt²⁵.

Der Inhibitor aus Schafspankreas läßt sich durch Chromatographie an DEAE-Cellulose⁷ in 4 Frak-

tionen auftrennen (Abb. 4). Frakt. II und IV besitzen jedoch dieselbe Aminosäurezusammensetzung wie das Ausgangspräparat (s. Tabelle), bei Frakt. III sind bei sonst ebenfalls identischen Werten die Serin- und Alanin-Werte wiederum erhöht, jedoch nicht gradzahlig („integer“). Wir führen dies auf Begleitsubstanzen zurück, die vom Inhibitor auf unspezifische Weise adsorbiert werden.

Das reaktive Zentrum des Inhibitors aus Rinderpankreas stellt wahrscheinlich die Arg-Ile-Bindung in Stellung 18–19 der Peptidsequenz dar²⁶. Beim Inhibitor aus Schafspankreas ist ebenfalls ein Argininrest für die Reaktion mit Trypsin verantwortlich²⁷.

Im Gegensatz zum Pankreas des Rindes, das den KAZAL-Typ-Inhibitor und den polyvalenten Trypsin-Kallikrein-Inhibitor in etwa gleicher Menge enthält, kommt im Pankreas des Schafes nur der KAZAL-Typ-Inhibitor vor.

Wir danken der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGESELLSCHAFT, SFB-51 München, für Sach- und Personalmittel.

²⁵ R. SCHYNS, S. BRICTEUX-GRÉGOIRE u. M. FLORKIN, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **175**, 97 [1969].

²⁶ M. RIGBI u. L. J. GREENE, *J. biol. Chemistry* **243**, 5457 [1968].

²⁷ H. FRITZ, E. FINK, M. GEBHARDT, K. HOCHSTRASSER u. E. WERLE, *diese Z.* **350**, 933 [1969].

²⁴ H. TSCHESCHE u. H. KLEIN, *diese Z.* **349**, 1645 [1968].

Zur Primärstruktur des spezifischen Trypsininhibitors aus Schafpankreas

VON KARL HOCHSTRASSER, WOLFGANG SCHRAMM, HANS FRITZ, SIBYLLE SCHWARZ UND EUGEN WERLE

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München
(Direktor Prof. Dr. Dr. E. Werle)*

(Der Schriftleitung zugegangen am 24. April 1969)

Zusammenfassung: Durch die Analyse der tryptischen Peptide des reduzierten und carboxymethylierten spezifischen Trypsininhibitors aus Schafpankreas wurde nachgewiesen, daß in Position 32

der Peptidkette gegenüber den Befunden beim Inhibitor aus Rinderpankreas ein Serinrest durch einen Alaninrest ersetzt ist.

Summary: *The primary structure of the specific trypsin inhibitor from sheep pancreas.* The tryptic peptides of reduced and carboxymethylated specific trypsin inhibitor from sheep pancreas were an-

alysed. It was found that position 32 of the peptide chain is occupied by alanine; in the inhibitor from bovine pancreas, this position is occupied by serine.

Wie aus einer folgenden Arbeit hervorgeht¹, gelingt es, den spezifischen Trypsininhibitor aus Schafpankreas mit Hilfe der Trypsinharzmethode rasch und in hoher Reinheit herzustellen. Da von der Arbeitsgruppe GREENE² die Aminosäuresequenz des spezif. Trypsininhibitors aus Rinderpankreas aufgeklärt wurde, erschien es uns sinnvoll, die Primärstruktur des spezif. Trypsininhibitors aus Schafpankreas zu untersuchen. Die nahe genetische Verwandtschaft der beiden Species ließ nur geringe Unterschiede in den Aminosäuresequenzen erwarten. Vergleichende Bausteinanalysen (s.l.c.¹) machten zudem wahrscheinlich, daß sich der Inhibitor des Schafpankreas höchstens durch einen zusätzlichen Alaninrest vom Inhibitor aus Rinderpankreas unterscheidet.

Ergebnisse

Aus den Untersuchungen von GREENE² am Rinderpankreasinhibitor geht hervor, daß zwischen Posi-

tion 19 und 42 der Peptidkette kein basischer Aminosäurerest vorhanden ist. Zur schnellen Lokalisierung der erwarteten Unterschiede in der Aminosäuresequenz erschien es uns deshalb günstiger, nach Reduktion die freien Cysteinreste nicht entsprechend der von GREENE verwendeten Technik zu aminoäthylisieren sondern zu carboxymethylieren. Durch diese Maßnahme war eine kleinere Anzahl tryptischer Peptide zu erwarten, da im Gegensatz zu aminoäthyliertem Cystein an carboxymethyliertem Cystein keine tryptische Spaltung stattfindet. Es war anzunehmen, daß die Aminosäuresequenz 19—42, welche von GREENE in Form von 4 Bruchstücken erhalten wurde, bei unserem Vorgehen als ein Peptid anfällt. Die Auftrennung der tryptischen Peptide erfolgte durch Chromatographie an Dowex 1X2, wobei im wesentlichen einheitliche Peptidfraktionen erhalten werden (Abbildung). Nur Frakt. 1 ergibt bei der Papierchromatographie 2 Peptide. Mit Peptiden des Inhibitors aus Rinderpankreas stimmten dabei völlig überein die Peptide Ia, III, IV, II, V, entsprechend den Sequenzen 1—5, 6—8, 43—44, 45—52 und 53—56. Das in Frakt. 1 vorhandene zweite Peptid (als Ib bezeichnet) wurde als identisch mit Peptid II erkannt. Die Zusammensetzung von Peptid XII entspricht der Aminosäurezusammensetzung der

* Postanschrift: Dr. K. HOCHSTRASSER, D-8 München 15, Nußbaumstraße 20.

¹ Siehe dazu H. FRITZ, B. GREIF, W. SCHRAMM, K. HOCHSTRASSER u. E. WERLE, diese Z., in Vorbereitung.

² L. I. GREENE u. I. S. GIORDANO JR., J. biol. Chemistry 244, 285 [1969].

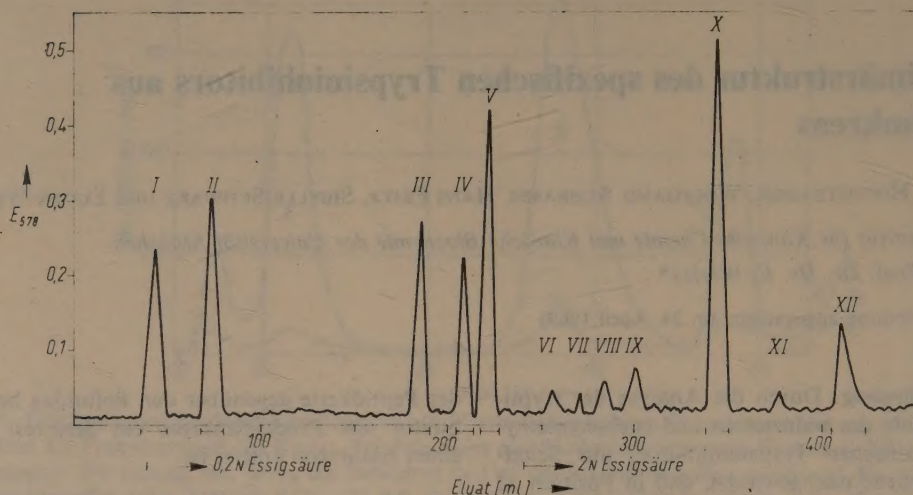


Abbildung. Trennung der tryptischen Peptide aus reduziertem und carboxymyliertem Trypsininhibitor aus Schafpankreas. Bedingungen: Dowex 1X2 in Collidin-Pyridinacetatpuffer, pH 8,4; Gradienten 0,2 bzw. 2,0M Essigsäure (Vorlage 500 ml). 2-ml-Fractionen. Zur Ninhydrinreaktion wurde je 0,1 ml entnommen.

Sequenz 9–18, welche infolge der anderen Technik beim Rinderpankreasinhibitor in 2 Bruchstücken, nämlich als freies Aminoäthylcystein und als Peptid der Sequenz 10–18 erhalten wird. Die einzige Abweichung gegenüber den Befunden beim Rinderpankreasinhibitor ist in Peptid X lokalisiert, das die Sequenz 19–42 repräsentiert. Es wurde gefunden, daß der in diesem Peptid die Position 32 (in Bezug auf das Gesamtmolekül) einnehmende Serinrest im Inhibitor aus Schafpankreas durch Alanin ersetzt ist. Chymotryptische Spaltung dieses Peptids liefert neben den beiden Peptiden, die die Sequenz 18–19 und 20–31 wiedergeben, ein Peptid mit aminoendständigem Alanin und sonst gleicher Zusammensetzung wie bei der Sequenz 33–42. Die Ergebnisse der Peptidanalysen sind in Tab. 1 den Ergebnissen von GREENE am Rinderpankreasinhibitor gegenübergestellt.

Diskussion

Infolge der außerordentlichen Ähnlichkeit der beiden Pankreasinhibitoren kann angenommen werden, daß die Reihenfolge der tryptischen Peptide und die Aminosäuresequenzen innerhalb der Peptide in beiden Fällen identisch sind. Auf die Isolierung überlappender Peptide und die Sequenzanalyse wurde aus diesem Grund verzichtet. Bei der Betrachtung der Ausbeuten der einzelnen tryp-

tischen Peptide fällt auf, daß das aminoendständige Pentapeptid im Vergleich zu den übrigen nur mit einer Ausbeute um 50% erhalten wird. Wie aus der Endgruppenanalyse des unveränderten Inhibitors hervorgeht, werden neben kleinen Mengen Iso-leucin die beiden Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure in praktisch gleichen Mengen gefunden. Wir nehmen an, daß unser Inhibitorpräparat aus einem Gemisch von 2 Komponenten besteht, wobei die eine Komponente nur um das aminoendständige Pentapeptid verkürzt ist. Das Auftreten von Glutaminsäure als 2. Endgruppe ist dadurch zu erklären. Das Fehlen des Pentapeptids verändert den Ladungscharakter des Inhibitors nicht, wodurch die elektrophoretische oder chromatographische Trennung beider Komponenten sehr erschwert ist. Außerdem zeigt dieser Befund, daß das aminoendständige Peptid für die Hemmwirkung des Inhibitors unwesentlich ist.

Es kann weiterhin angenommen werden, daß diese Unterschiede in der Kettenlänge beider Komponenten entweder durch unvollständige Biosynthese oder durch Einwirkung von Trypsin im Pankreas oder während der Komplexbildung mit Trypsinharz zustandekommen. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß GREENE³ aus Schweinepankreassekret 2 Inhibitoren isolieren konnte, die beide die

³ L. I. GREENE, I. I. DI CARLO, A. I. SUSSMANN u. D. C. BARTELT, J. biol. Chemistry **243**, 1804 [1968].

Tab. 1. Zusammenstellung der tryptischen Peptide der Inhibitoren aus Rinderpankreas nach Reduktion und Aminoäthylierung² und aus Schafpankreas nach Reduktion und Carboxymethylierung.

	Rind Sequenz-Nr.							Schaf Peptid-Nr.						
	1—5	6—8	9—18	19—42**	43—44	45—52	53—57	Ia	III	XII	X	IV	II	V
Cystin/2*	—	—	2	3	—	—	1	—	—	2	3	—	—	1
Asp	1	—	2	4	—	—	—	1	—	2	4	—	—	—
Thr	—	—	1	2	—	1	—	—	—	1	2	—	1	—
Ser	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1
Glu	—	1	1	2	1	2	—	—	1	1	2	1	2	—
Pro	—	—	1	1	—	1	1	—	—	1	1	—	1	1
Gly	1	—	1	2	—	—	1	1	—	1	2	—	—	1
Ala	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—
Val	—	—	1	2	—	1	—	—	—	1	2	—	1	—
Met	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Ile	1	—	—	1	—	1	—	1	—	—	1	—	1	—
Leu	1	—	—	2	—	1	—	1	—	—	2	—	1	—
Tyr	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—
Lys	—	1	—	1	—	1	—	—	1	—	1	—	1	—
Arg	1	—	1	—	1	—	—	1	—	1	—	1	—	—

* Cystein wird als Aminoäthylcystein bzw. Carboxymethylcystein erhalten.

** Summe der Peptide 19—24, 25—35, 36—38, 39—42.

gleiche Grundsequenz besitzen. Dabei ist eine Komponente nur durch ein aminoendständiges Tetrapeptid verlängert. (Diese Tatsachen sprechen für unsere ersten beiden Erklärungsversuche.)

Das Vorhandensein einer dritten Endgruppe, Iso-leucin, dürfte durch Modifikation bei der Komplexbildungsreaktion mit Trypsinharz zu erklären sein. Wie in einer Reihe von Arbeiten⁴⁻⁷ belegt wurde, kommt es während der Komplexbildung der meisten Trypsininhibitoren zur Spaltung einer definierten Arg-X- oder Lys-X-Bindung in den Inhibitormolekülen, welche als aktive Zentren der Hemmstoffe angesehen werden. Die Arg-Ile-Bindung in Position 18—19 bildet im vorliegenden Fall offensichtlich das aktive Zentrum des Inhibitors.

Methoden

Dünnschichtchromatographische Endgruppenbestimmung nach Dinitrophenylierung

Trypsin Trypure, Novo; Chymotrypsin Chymotrypure,

⁴ H. TSCHESCHE, diese Z. **348**, 1216 [1967].

⁵ K. OZAWA u. M. LASKOWSKI JR., J. biol. Chemistry **241**, 3955 [1966].

Novo. Papierchromatographie im System Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 5:2:0,6:2,4.

1. Reduktion und Carboxymethylierung

172 mg Inhibitor werden nach HIRSE, MOORE und STEIN⁸ reduziert und mit Jodacetamid carboxymethyliert. Die Abtrennung der Reagenzien nach der Umsetzung wurde durch Gelfiltration über Sephadex G-25 in 0,1N Pyridinacetatpuffer, pH 3,1, erreicht (Säule 1 × 200 cm). Das Proteinmaterial im Eluat (2-m/-Fraktionen) wird durch Ninhydrinfärbung nach alkalischer Hydrolyse lokalisiert. Die Proteinfractionen werden vereinigt und nach Entfernung des Lösungsmittels gefriergetrocknet.

2. Tryptische Spaltung und Peptidtrennung

Das unter 1. erhaltene Material wird in 3 ml/ Wasser gelöst, mit 0,2N NaOH auf pH 8,0 eingestellt und 500 γ säurebehandeltes Trypsin (10 Std. in 0,0025N HCl) zugegeben. Der pH-Wert wird während der Spaltung laufend nachgestellt und nach 1 Std. werden nochmals

⁶ K. HOCHSTRASSER, M. MUSS u. E. WERLE, diese Z. **348**, 1337 [1967].

⁷ K. HOCHSTRASSER u. E. WERLE, diese Z. **350**, 249 [1969].

⁸ C. H. W. HIRSE, S. MOORE u. W. STEIN, J. biol. Chemistry **219**, 623 [1956].

Tab. 2. Analysenwerte der tryptischen Peptide aus Schafpankreasinhibitor und Analysenwerte der chymotryptischen Spaltstücke aus Peptid X (Anzahl der Aminosäurereste).

	Peptid-Nr. Ia	III	XII	X	IV	II	V	Chymotryptische Peptide aus X		
	Ausbeute* [%] 37	67	72	85	57	78	64	1	2**	3
Cystin/2	—	—	1,90	3,00	—	—	0,85	—	1,00	0,95
Asp	1,00	—	1,94	4,11	—	—	—	—	0,96	0,98
Thr	—	—	0,96	2,07	—	1,04	—	—	—	—
Ser	—	—	—	—	—	—	0,92	—	—	—
Glu	—	1,07	1,03	2,08	1,04	2,00	—	—	0,98	0,95
Pro	1,03	—	0,97	1,20	—	1,00	0,97	—	—	—
Gly	—	—	1,00	2,05	—	—	1,00	—	—	—
Ala	—	1,03	—	0,95	—	—	—	—	0,97	—
Val	—	—	0,86	1,89	—	0,86	—	—	—	—
Met	—	—	—	0,65	—	—	—	—	—	0,55
Ile	0,89	—	—	0,95	—	0,96	—	1,00	—	—
Leu	0,89	—	—	2,05	—	1,06	—	—	1,00	1,00
Tyr	—	—	—	1,65	—	—	—	0,65	—	—
Lys	—	1,00	—	1,00	—	1,00	—	—	—	1,00
Arg	1,00	—	0,93	—	1,00	—	—	—	—	—
Endgruppe	Asp	Glu	Cys	Ile	Glu	Glu	Ser	Tyr	Ala	Leu

* Bezogen auf eingesetztes Inhibitormaterial.
** Peptid 2 + 3 entspricht Pos. 32—42.

200 γ Trypsin zugegeben. Nach 3 Std. wird das Spaltgemisch direkt auf eine Dowex-1X2-(200—400 mesh)-Säule (1 × 150 cm, Puffer Pyridin-Collidinacetat, pH 8,4) aufgegeben und bei 40°C nach RUDLOFF und BRAUNITZER⁹ mit Essigsäuregradienten (0,2—2,0M) eluiert (2-m/-Fraktionen). Die durch Ninhydrinfärbung nach alkalischer Hydrolyse identifizierten Peptidfraktionen werden lyophilisiert und ausgewogen.

3. Reinheitsprüfung und Analyse der Peptide
Die Papierchromatographie ergab mit Ausnahme von Frakt. 1 Einheitlichkeit der Peptide. Das Gemisch aus

2 Peptiden der Frakt. 1 wird chromatographisch getrennt, die einzelnen Peptide hydrolisiert und am Beckman-Unichrom-Aminoanalyzer analysiert (Analysenwerte Tab. 2).

4. Chymotryptische Spaltung
Die chymotryptische Spaltung von Peptid X wurde wie üblich durchgeführt, die Spaltprodukte chromatographisch getrennt und analysiert (Analysenwerte Tab. 2).

⁹ V. RUDLOFF u. G. BRAUNITZER, diese Z. 323, 129 [1961].

Lebenslauf:

Wolfgang Schramm

- 03.11.1943 Geboren in Sulzberg/Kempton als drittes Kind des Gendarmerieleutnants Georg Schramm und seiner Frau Josefa (geb. Wagner)
- Mai 1945 Nach dem Tod meines Vaters (gefallen in Marienbad) Übersiedlung nach Oettingen/Bay.
- 1949 - 1954 Volksschule; Oettingen/Bay.
- 1954 - 1960 Humanistisches Gymnasium (Kl. 1 - 6); Oettingen/Bay.
- 1960 - 1963 Oberrealschule mit Gymnasium; Nördlingen im Ries
- Abitur : 1963
- Okt. 1963-
- März 1965 Wehrdienst bei Artillerieeinheiten in Donauwörth, Pfullendorf u. Idar Oberstein
- Dienstgrad : Leutnant d. Res.
- SS 65 Beginn des Medizinstudiums an der Universität München
- WS 65/66 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
- SS 67 Ärztliche Vorprüfung
- März 1968 -
- Juni 1969 Doktorand am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München
- 18.12.1970 Ärztliche Prüfung
- 30.01.1971 Heirat mit der Ärztin Brigitte Greif

